

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 04-324358

(43) Date of publication of application : 13.11.1992

(51) Int.Cl. G01N 33/53
G01N 33/532

(21) Application number : 03-122516 (71) Applicant : TEIKOKU SEIYAKU CO LTD

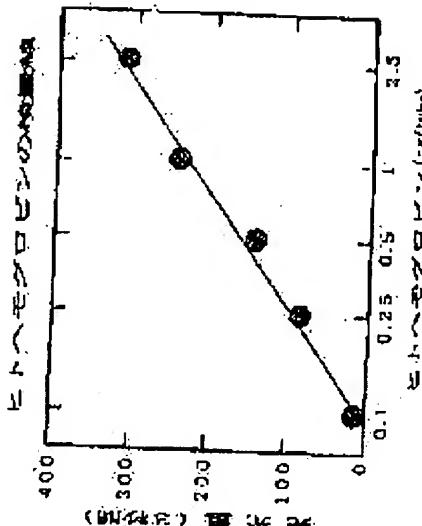
(22) Date of filing : 24.04.1991 (72) Inventor : FUJII TAKASHI
SAKO SEIICHI
TADA CHIYOMI

(54) MEASUREMENT METHOD OF HUMAN HEMOGLOBIN IN DEJECTION

(57) Abstract:

PURPOSE: To enable measurement of human Hb in dejection in a short time with a handy operation by measuring it by a chemiluminescence method with the presence of an oxidizing agent using an anti-human hemoglobin Hb antibody and luminol or a luminol derivative.

CONSTITUTION: Human Hb in dejection as a sample to be measured is bonded selectively to an anti-human Hb antibody converted to a solid phase. The Hb thus bonded is used as catalysis to make a proper oxidizing agent such as hydrogen peroxide react with luminol or a luminol derivative and chemiluminescence generated is measured to determine the human Hb. This enables direct measurement by a catalytic action of the human Hb itself bonded to the anti-human Hb thereby shorting measuring time remarkable with a simple operation. It should be noted that this measurement method enables the measured of the human Hb very linearly from about 100pg.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

v

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-324358

(43)公開日 平成4年(1992)11月13日

(51)Int.Cl.⁵

G 0 1 N 33/53
33/532

識別記号 庁内整理番号

K 8310-2 J
B 8310-2 J

F I

技術表示箇所

(21)出願番号

特願平3-122516

(22)出願日

平成3年(1991)4月24日

(71)出願人 000215958

帝國製薬株式会社

香川県大川郡大内町三本松567番地

(72)発明者 藤井 尊

徳島県鳴門市撫養町木津1093

(72)発明者 佐幸 誠一

徳島県阿南市横見町中川原21-1

(72)発明者 多田 千代美

香川県木田郡三木町田中4035-2

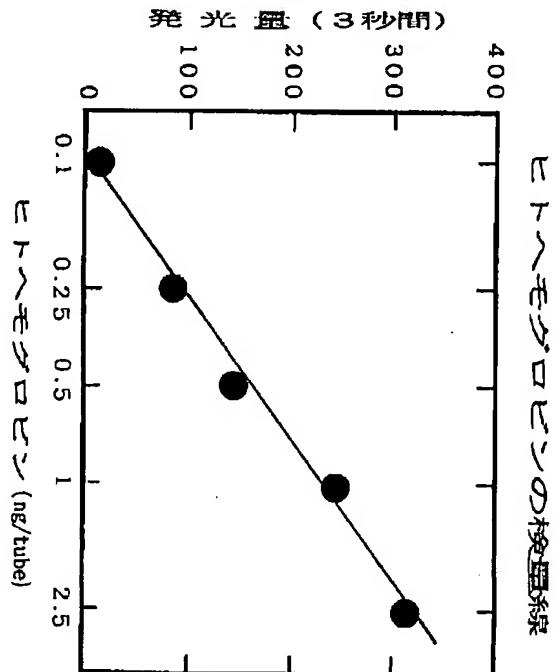
(74)代理人 弁理士 植木 久一

(54)【発明の名称】糞便中のヒトヘモグロビン測定法

(57)【要約】

【構成】糞便中のヒトヘモグロビンを、抗ヒトヘモグロビン抗体、及びルミノール或はルミノール誘導体を用いて酸化剤の存在下に化学発光法により測定する方法。

【効果】多くの検体を短時間に感度良く、しかも簡便に測定できる方法を提供できる様になった。即ち本発明の方法は従来の酵素免疫抗体法と同等以上の感度を有し、しかもより簡便な方法である。



1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 粪便中のヒトヘモグロビンを、抗ヒトヘモグロビン抗体、及びルミノール或はルミノール誘導体を用いて酸化剤の存在下に化学発光法により測定することを特徴とする糞便中のヒトヘモグロビン測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は大腸癌や結腸癌等による消化管出血の有無及び程度を調べるために用いられる糞便中のヒトヘモグロビン測定法に関するものである。本発明の測定法は測定に要する時間が短く、食事制限等を必要とせず、しかも簡便な方法であるので集団検診等多数の検体を処理する場合に特に有用である。

【0002】

【従来の技術】 粪便中の潜在性血液（以下潜血と略す）の有無を調べることは消化管疾患、中でも大腸癌や結腸癌等の消化管出血を伴う疾患の診断に大変有効であり現在幅広く用いられている。

【0003】 従来行なわれていた潜血の定量あるいは定性試験は、血液中に含まれるヘモグロビンの有する触媒作用を化学反応により測定するものであり、代表的なものとしてO-トリジン法やグアヤック法等がある。これらの方法は操作自体は簡便であるが、動物食品中に含まれるヘモグロビンや植物蛋白質、更には金属塩等による影響を受けるため、被検者はわずらわしい食事制限を余儀なくされていた。従ってこれらの方法を集団検診等に用いることはかなり難しいことであった。

【0004】 そこで近年上記問題を解決する方法としてヒトヘモグロビン（以下ヒトHbと略す）と特異的に反応する抗ヒトHb抗体を用いた免疫学的方法が開発され、広く用いられるようになってきた。

【0005】 これらのこととして例えば抗ヒトHb抗体を含む寒天平板を用い、加えた試料中のHbとの免疫沈降線の形成の有無によって判定する一次元免疫拡散法（ゾングスター等、Cancer, 45, 1099(1980)）が知られているが、この方法は感度が低く多くの試料を必要とするという欠点を有している。

【0006】 そこで抗ヒトHbポリクローナル抗体を結合させたラテックス粒子の凝集により判定するラテックス凝集法（特開昭59-125064号公報）及びラテックス凝集法の欠点であるHb濃度が高すぎる時に起こるプロゾーン現象の発生を考慮し、ヒトHbを結合させたラテックスと抗ヒトHb抗体を用い、ヒトHb（抗原）を凝集阻害因子として作用させ、凝集の起らないものを陽性とするラテックス凝集抑制法（特開昭63-289453）が簡便で感度に優れた方法として開発された。しかしこれらの方法も感度($0.25 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 20 \mu\text{g}/\text{ml}$)が十分に高いとは言えず、また一度に数検体しか測定できないので多数の検体の処理には不向きな方法である。

【0007】 感度の点ではサンドイッチ法による酵素免

50

2

疫測定法（EIA）が優れており、またこの方法は多数の検体を一度に処理できるという利点を有している。しかしながらEIAは前述したそれぞれの方法に比べ、測定操作が複雑でしかも測定に長時間を有するという欠点をもっている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は以上の様な状況に鑑みてなされたものであって、測定操作が簡便で、しかも酵素免疫測定法と同等、若しくはそれ以上の測定感度を有し、多数検体を同時に処理できる免疫学的測定法を提供しようとするものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】 本発明の糞便中のヒトHb測定方法は、糞便中のヒトHbを、抗ヒトHb抗体、及びルミノール或はルミノール誘導体を用いて酸化剤の存在下に化学発光法により測定することに要旨がある。

10
20

【0010】

【作用】 本発明者らは、上記の様な方法を開発することを目的として銳々努力を重ねた結果、固相化した抗ヒトHb抗体に、被測定試料である糞便中のヒトHbを選択的に結合させ、この結合したHbを触媒として、過酸化水素など適当な酸化剤とルミノールあるいはルミノール誘導体を反応させ、生じた化学発光を測定することによりヒトHbを測定する方法を完成するに至った。

30

【0011】 ルミノール或はルミノール誘導体は過酸化水素の存在下に血液等と反応して発光することは一般によく知られている。しかしこの発光はヒトHbに対して特異的なものではなく動物のHbやヘミン等とも反応し発光を生じるので、本発明においては抗ヒトHb抗体にヒトHbを結合させることによって選択性を高めるものである。更に通常のEIA（サンドイッチ法）では抗ヒトHb抗体に結合したヒトHbに、更に酵素標識抗ヒトHb抗体を結合させる必要があるので、操作が煩雑となり測定に長時間を要するが、本発明では抗ヒトHbに結合したヒトHb自身の触媒作用により直接測定が可能であることから、操作も簡単になり、その結果測定時間を著しく短縮することができる。

40

【0012】 更に測定方法に沿って具体的に説明する。まず検体（糞便）を適当な緩衝液等に懸濁し、遠心分離或は濾過等により上澄み液を得るか、或はろ紙等で吸水することよりその液体成分を抽出する。得られた液体成分を例えば、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ナイロン等の合成プラスチック材、ガラスやニトロセルロースフィルム、あるいはシリコンビーズなどの免疫反応用固相化担体に固定化された抗ヒトHb抗体と反応させることにより、液体成分中のヒトHbを分離する。ここで抗ヒトHb抗体としてはモノクローナル抗体を用いることが好ましいが、ポリクローナル抗体を用いることも可能である。

【0013】 抗ヒトHb抗体に結合したヒトHbを触媒

3

とし、ルミノール或はルミノール誘導体と過酸化水素水を反応させる。この際ルミノール或はルミノール誘導体または過酸化水素水を反応開始剤として用い、生じたルミノール発光を検出器により測定する。上記ルミノール誘導体としてはイソルミノールや6-N-(4-アミノブチル)-エチル-2,3-ジヒドロ-1,4-フタルヒドラジンジオン等の様なヒトHbと反応してルミノール発光を生じるものを全て使用することができる。また本発明では、酸化剤として過酸化水素水を用いたが、他のNaBO₃、As(V)、Au(III)等の酸化剤を用いることも当然本発明に包含される。

【0014】以下実施例によって本発明を更に詳述するが、下記実施例は本発明を制限するものではなく、前・後記の趣旨を逸脱しない範囲で変更実施することは全て本発明の技術範囲に包含される。

【0015】

【実施例】

実施例1

ヒト糞便を一部採取し、0.1%牛血清アルブミン(BSA)を加えDulbecco処方リン酸緩衝液(pH 7.4)に溶解した後、4℃、9000g×10minで遠心分離を行なった。得られた上澄み液を希釈液とした。該希釈液を用いてヒトHb(Sigma社製)標準液を調製した。また抗ヒトHbモノクローナル抗体(帝國製薬(株)製)を0.1M炭酸重炭酸緩衝液(pH9.6)を用いてマウスIgG₁(A₂₈₀(1%)=1.5)量で10μg/mlに調製し、グレイナー社製イミュロン600チューブに100μl/tube加え37℃で1時間放置して、抗体を固相化した。0.05% tween20/PBSで十分に洗浄した後、0.1% BSAを加え、

10

20

室温で30分間放置してブロッキングを行なった。前回と同様0.05% tween20/PBSで十分に洗浄後、10ng/mlになる様に調製したヒトHb標準液を加え、室温で1時間放置した後、0.05% tween20/PBSで十分に洗浄した。

【0016】該反応チューブに純水を100μl加え、更に1μMルミノール/0.1Mグリシン緩衝液(pH11.0)を加え混和した後、極微弱発光検出器(CLEA-I, 帝國製薬(株)製)に入れ20mM H₂O₂を自動注入後6秒間の発光量を測定した(5回)。測定時のチャードを緩衝液を用いたプランクのチャート(4回)と共に図1に示す。図1に示される様に本発明の測定方法は優れた再現性を有していた。

【0017】実施例2

実施例1に準じ、ヒトHb標準液を用いてチューブ当たり50pg, 100pg, 1ng, 5ngに調製し、実施例1と同様にして発光量を測定した。測定値を用いて作成したヒトHbの検量線を図2に示す。本発明の方法により、ヒトHbは100pgより極めて直線的に測定できることがわかった。

【0018】

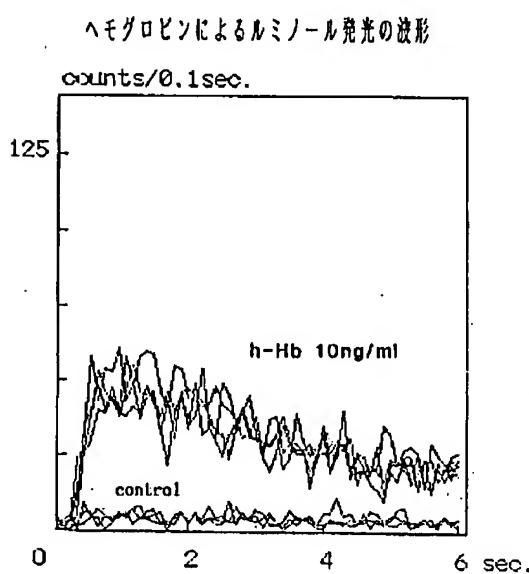
【発明の効果】本発明は以上の様に構成されており、多くの検体を短時間に簡便に測定できる方法を提供できる様になった。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1の測定結果を示す図。

【図2】実施例2において作成されたヒトHbの検量線を示すグラフ。

【図1】



【図2】

